

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO DE HIDRÓLISIS DE PULMÓN BOVINO CON PAPAÍNA PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON PODER ANTIOXIDANTE

F.G. Martinez¹; V. A. Ambrosi¹; A. M. Sancho¹; N. Szerman^{1,2}

1. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto Tecnología de Alimentos (Argentina).

2. CONICET – Argentina.

E-mail: martinez.fernanda@inta.gob.ar

RESUMEN

Existen varias razones por las cuales el consumo de subproductos bovinos no se encuentra explotado en todo su potencial. Entre ellas se encuentran: percepción negativa por parte de los consumidores, prácticas culturales o tradicionales de consumo, restricciones religiosas o éticas, o temas de salud pública. El pulmón es de particular interés, ya que es un órgano relativamente grande que actualmente tiene un bajo valor comercial y tiende a ser usado principalmente para la elaboración de alimento para mascotas. El pulmón tiene un contenido de proteína de aproximadamente 170 g/kg, que puede ser extraída y utilizada en alimentos con fines tecnológicos o de fortificación; o hidrolizada para obtener compuestos funcionales o bioactivos. El objetivo de este trabajo fue optimizar la producción de péptidos con capacidad antioxidante mediante la hidrólisis de pulmón bovino con papaína. Para ello, se utilizó un diseño central compuesto de tres factores el cual consistió de 15 experimentos (con tres repeticiones del punto central). Los factores estudiados fueron: relación enzima/sustrato (ES; 0,65-4,85), temperatura (T; 59-75°C) y pH de reacción (6-8). El sustrato se preparó en una concentración de proteínas de 4% en buffer fosfato 0,1N al pH establecido por el diseño experimental. El sustrato homogeneizado se colocó en un baño termostático con agitación a 40 o.p.m. a las temperaturas establecidas por el diseño experimental. Luego, se agregó la enzima papaína (Sigma-Aldrich) en las distintas relaciones E/S establecidas por el diseño de optimización. La hidrólisis se finalizó a los 120 min de reacción mediante inactivación térmica a 100°C por 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm-15 min a 4°C y se conservó el sobrenadante para su estudio. La actividad antioxidante se midió por los métodos de capacidad de bloqueo de los radicales ABTS y DPPH y capacidad de reducción del hierro férrico FRAP. Los coeficientes de regresión para los parámetros ABTS, DPPH y FRAP se obtuvieron por regresión lineal múltiple. El modelo obtenido fue significativo para las tres variables estudiadas ($p < 0,05$), y los coeficientes R^2 fueron 0.90; 0.77 y 0.74 para ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente.

La actividad antioxidante evaluada por el método de ABTS fue afectado de manera lineal (negativa) por el pH y cuadrática (negativa) por la relación E/S. Además, las interacciones TxE/S y TxpH fueron significativas. Por otra parte, la actividad antioxidante, evaluada por el método de DPPH, fue afectada significativamente ($p < 0,05$) por las interacciones TxpH y E/SxpH. La actividad antioxidante, evaluada

como la capacidad de reducción del hierro férrico FRAP, fue modificada significativamente de manera lineal (positiva) por el pH y cuadráticamente por la T y la ES. Se utilizó la función de deseabilidad para determinar la combinación de factores que maximizó la obtención de péptidos antioxidantes. De este análisis se determinó que la combinación óptima de factores fue: pH 8, relación E/S 3,2 y temperatura 59°C.

Palabras Clave: subproductos, capacidad antioxidante, hidrólisis proteolítica, superficie de respuesta.

1. Introducción

Como principal producto de la faena bovina se obtiene la carne. Simultáneamente, se produce un número importante de subproductos, entre los que se encuentran huesos, tendones, piel, contenido del sistema gastrointestinal, sangre y órganos internos. Su utilización eficiente es muy importante para la rentabilidad de la industria, ya que representan aproximadamente un 66% del peso del animal, aportando un 11,4% del ingreso bruto de la faena (Rahman, Sahar, & Khan, 2014). La percepción negativa por parte de los consumidores, las prácticas culturales o tradicionales de consumo, las restricciones religiosas o éticas, o temas de salud pública son algunas de las razones por las cuales el consumo de subproductos bovinos no se encuentra totalmente aprovechado. Entre estos subproductos, el pulmón es de particular interés, por su alto contenido de proteína (170 g/kg) y su bajo valor comercial. Estas proteínas pueden ser extraídas y utilizadas en alimentos con fines tecnológicos o de fortificación; o hidrolizadas para obtener compuestos funcionales o bioactivos.

El objetivo de este trabajo fue optimizar la producción de péptidos con capacidad antioxidante mediante la hidrólisis de pulmón bovino con papaína.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

El pulmón se acondicionó retirando la grasa y los restos de tráquea y bronquios, y se procesó en una picadora con una placa de picado de 3 mm (Hobart, Ohio, EEUU). Luego, se envasó al vacío en bolsas Cryovac CN640 (Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina) y conservó a -40°C (Righi, Argentina) hasta su procesamiento.

2.2. Diseño experimental

Para estudiar el efecto simultáneo de los factores pH, temperatura (T) y relación enzima/sustrato (E/S) en la hidrólisis de pulmón bovino con papaína se planteó un diseño de optimización central compuesto (Gutiérrez Púlido & de la Vara Salazar,

2008). En la Tabla 1 se presentan los valores codificados y reales de cada uno de los factores estudiados y sus niveles.

Tabla 1: Valores reales y codificados de pH, T y E/S del diseño central compuesto.

Tratamiento	Variables codificadas			Variables reales		
	T	E/S	pH	T (°C)	E/S (%)	pH
1	-1	-1	-1	59	1,5	6,4
2	1	-1	-1	71	1,5	6,4
3	-1	1	-1	59	4	6,4
4	1	1	-1	71	4	6,4
5	-1	-1	1	59	1,5	7,6
6	1	-1	1	71	1,5	7,6
7	-1	1	1	59	4	7,6
8	1	1	1	71	4	7,6
9	-1,68	0	0	55	2,75	6
10	1,68	0	0	75	2,75	6
11	0	-1,68	0	65	0,65	6
12	0	1,68	0	65	4,85	6
13	0	0	-1,68	65	2,75	7
14	0	0	1,68	65	2,75	8
15	0	0	0	65	2,75	6
16	0	0	0	65	2,75	6
17	0	0	0	65	2,75	6

Las variables respuesta (capacidad antioxidante medida según las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP) fueron representadas por un diseño cuadrático completo conteniendo 10 coeficientes, el cual se ajustó a la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii} + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

donde Y es la variable respuesta; β_0 es la constante, β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes para los efectos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente; y x_i son las variables independientes codificadas.

2.3. Preparación de las muestras y proceso de hidrólisis

El pulmón picado se homogeneizó con buffer fosfato 0,1 N (pH establecidos por el diseño experimental) en una multiprocesadora (Minipimer, Braun), para obtener una concentración final de proteínas de 4% (p/p). Luego, se colocaron 60 mL de los homogeneizados en Erlenmeyers de 125 mL. A continuación, éstos se colocaron en un baño termostático a las temperaturas establecidas por el diseño experimental con una agitación de 40 r.p.m. (Vicking mod. Dubnoff, Buenos Aires, Argentina). La enzima papaína se agregó en las distintas relaciones enzima:sustrato, establecidas por el diseño

experimental. La hidrólisis se detuvo a los 120 min de reacción en un baño María a 100°C durante 20 min. Los hidrolizados se centrifugaron a 10000 rpm por 15 min a 4°C (Sorvall, mod. RC3C). Los sobrenadantes se conservaron a -40°C hasta su posterior estudio.

2.4. Concentración de proteínas

El contenido proteico de los hidrolizados se cuantificó mediante el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

2.5. Medición de la actividad antioxidante

2.5.1. Capacidad secuestrante del radical DPPH

Se determinó según el método descrito por Bersuder *et al.* (1998), con ligeras modificaciones. Se colocaron 30 µL de cada uno de las diluciones de los hidrolizados, en microplacas de 96 pocillos, y se adicionaron 200 µL de solución de DPPH 0,1 mM en metanol. Las absorbancias se leyeron a 517 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH). La capacidad antioxidante se expresó como la concentración de péptidos (mg/ml) necesaria para inhibir el 50% de DPPH (IC50).

2.5.2. Capacidad secuestrante del radical ABTS

Se determinó según el método descrito por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Se colocaron 50 µL de distintas diluciones de cada hidrolizado obtenido en microplacas y se les agregaron 200 µL de reactivo ABTS. Las absorbancias se leyeron a 734 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (SPECTROstar, Nano, BMG LABTECH). La capacidad antioxidante de las muestras se expresó como la concentración de péptidos (mg/ml) necesaria para inhibir el 50% de ABTS (IC50).

2.5.3. Capacidad de reducción del hierro

Se evaluó basado en el protocolo de Wu *et al.* (2007). Se colocaron 43,8 µL de distintas diluciones de cada hidrolizado obtenido en microplacas, se les agregó 150 µL de reactivo FRAP y se incubaron durante 15 min a 37°C. Paralelamente, se realizó una curva de Trolox (0-0,32 mM). Las absorbancias se midieron a 593 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (SPECTROstar, Nano, BMG LABTECH). El resultado se expresó en mM de Trolox por mg de proteína del hidrolizado.

2.6. Análisis estadístico

Los valores de los coeficientes de las variables independientes para cada variable de respuesta (capacidad secuestrante de los radicales DPPH y ABTS y Capacidad de reducción del hierro) se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal múltiple. El nivel de significación se determinó utilizando la prueba F ($p < 0,05$). Aquellas variables independientes que fueron significativas ($p < 0,05$) en los modelos completos se retuvieron en los modelos reducidos. Esos modelos reducidos se utilizaron para generar las superficies de respuesta y los gráficos de contorno.

Para optimizar las condiciones del proceso de hidrólisis enzimática se aplicó la función de deseabilidad (Derringer & Suich, 1980). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA (versión de prueba 12, Stat Soft, OK, USA)

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización de los parámetros de hidrólisis

En la Tabla 2 se presentan los coeficientes de regresión obtenidos por aplicación del análisis de regresión lineal múltiple para la capacidad antioxidante evaluada por los distintos métodos: ABTS, DPPH y FRAP.

Tabla 2: Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes a los valores de capacidad antioxidante evaluados por los métodos de ABTS, DPPH y FRAP de los hidrolizados de pulmón.

	ABTS	DPPH	FRAP
Constante	1,076*	17,424*	0,0483*
Lineales			
T	0,026	-0,902	-0,0009
E/S	-0,048	0,537	0,0005
pH	-0,323*	-0,510	0,0041*
Cuadráticas			
T ²	-0,062	-0,578	-0,0028*
E/S ²	-0,104*	-0,597	-0,0034*
pH ²	0,053	-0,536	-0,0009
Interacciones			
TxE/S	0,121*	0,326	-0,0003
TxpH	0,119*	2,263*	-0,0005
E/SxpH	0,002	-1,805*	-0,0010
R ²	0,905	0,766	0,742
Falta de ajuste	0,117	0,198	0,067
Ecuaciones reducidas (valores codificados):			
ABTS = 1,066 - 0,323 pH - 0,102 ES ² + 0,121 TxES + 0,119 TxpH			
DPPH = 16,051 + 2,263 TxpH - 1,805 ESxpH			
FRAP = 0,0472 - 0,0025 T ² - 0,0032 ES ² + 0,0042 pH			

Para la variable ABTS, el ajuste al modelo cuadrático fue significativo ($p < 0,05$) y explicó un 90,5 % de las respuestas observadas ($R^2 = 0,905$), con falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$). El pH tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) lineal negativo; por lo tanto, al aumentar el pH se lograron los menores valores de IC₅₀ para ABTS (péptidos con mayor poder antioxidante). Además, la interacción TxpH fue significativa ($p < 0,05$), obteniéndose los valores mínimos de IC₅₀ para ABTS a las menores temperaturas y mayores valores de pH (Figura 1.A). Asimismo, el término E/S^2 (negativo) y la interacción TxE/S fueron significativos ($p < 0,05$).

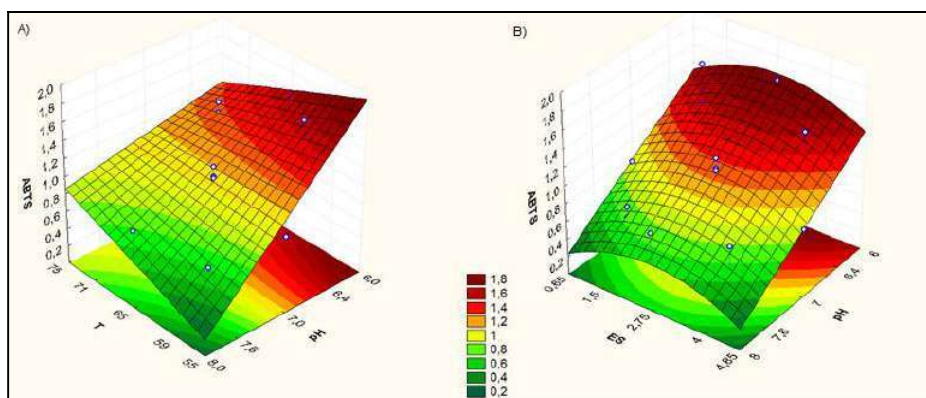


Figura 1. Gráficos de superficie de respuesta para evaluar el poder antioxidante de péptidos de pulmón bovino por el método de ABTS (IC₅₀): A) ABTS como una función del pH y T (valor de ES 2.75%) y B) ABTS como una función del pH y ES (valor de T 65°C).

Para la variable DPPH, el ajuste al modelo cuadrático fue significativo ($p < 0,05$) y explicó un 76,6% de las respuestas observadas ($R^2 = 0,766$), con falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$) (Tabla 2). La interacciones E/SxpH y TxpH fueron significativas ($p < 0,05$) en el modelo. En la Figura 2 se puede observar que se lograron los menores valores de IC₅₀ para DPPH (mayor actividad antioxidante de los péptidos) cuando los valores de pH y de E/S fueron los mayores, o bien los menores. Con relación a la interacción TxpH, se observó un comportamiento similar (Figura 2.B); los menores valores de IC₅₀ para DPPH se obtuvieron a los valores más altos o más bajos de los factores.

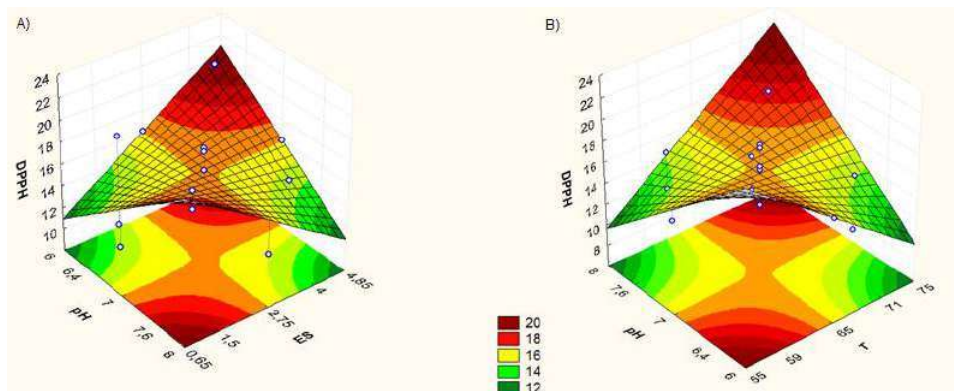


Figura 2. Gráficos de superficie de respuesta para evaluar el poder antioxidante de péptidos de pulmón bovino por el método de DPPH: A) DPPH como una función del pH y ES (valor de T 65°C) y B) DPPH como una función del pH y T (valor de ES 2,75%).

Por último, para FRAP el ajuste al modelo cuadrático fue significativo ($R^2=0,742$, falta de ajuste $>0,05$) (Tabla 2). El pH tuvo un efecto lineal positivo significativo ($p<0,05$); por lo tanto, a mayores valores de pH mayores valores de FRAP (Tabla 2, Figura 3.B). Además, las variables E/S y T tuvieron un efecto cuadrático significativo ($p<0,05$) (Tabla 2). En la Figura 3.A se presenta la superficie de respuesta obtenida en función de la E/S y la T. En esta se observa que los mayores valores de FRAP (mayor poder antioxidante) se obtuvieron a los valores medios de las variables ($T = 65^\circ\text{C}$ y $E/S = 2,75$), disminuyendo considerablemente en los valores extremos.

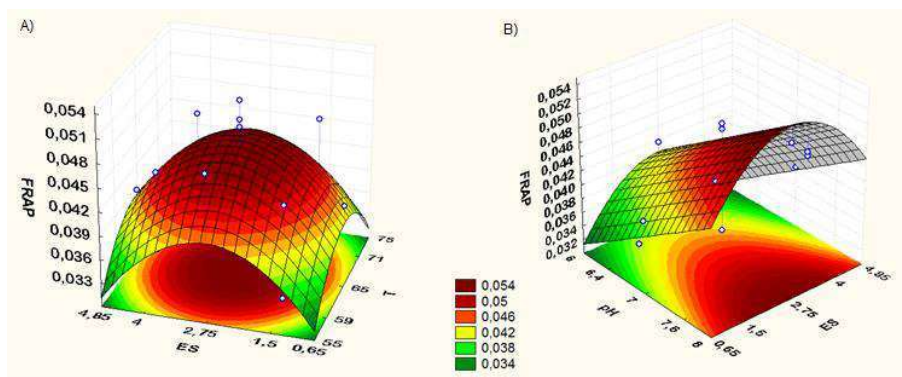


Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta para evaluar el poder antioxidante de péptidos de pulmón bovino por el método de FRAP: A). FRAP como una función de la T y ES (valor de pH 7 y; B). FRAP como una función del pH y ES (valor de T 65°C).

3.2. Optimización de los factores de proceso mediante la función deseabilidad

En este estudio de hidrólisis enzimática del pulmón se deseaba optimizar las variables de proceso (temperatura, relación enzima/sustrato y pH) de manera tal de maximizar la producción de péptidos antioxidantes. Para ello, se aplicó la función de deseabilidad, la cual permite definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global (DG) del producto en cada punto; convirtiendo el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado. Por lo tanto, maximizando la DG se obtiene el punto óptimo buscado.

En la Figura 4 se presentan los perfiles de valores predichos y deseabilidad obtenidos teniendo en cuenta que los valores de DPPH y ABTS debían ser mínimos (ya que estos representan la concentración de péptidos necesaria para lograr inhibir el 50% del radical) y los de FRAP debían ser máximos.

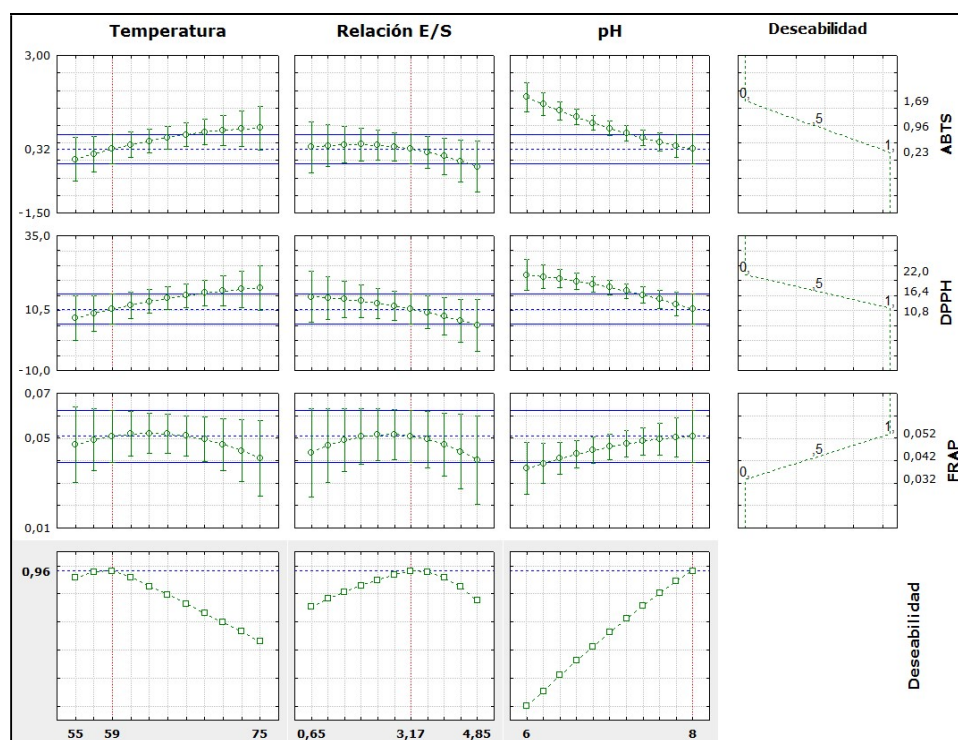


Figura 4. Perfiles de valores predichos y deseabilidad para la optimización de los factores de proceso.

De acuerdo con estos datos, la condición de proceso óptima predicha que conduce al valor máximo de deseabilidad global ($DG = 0.96$) para el proceso de hidrólisis es a una

temperatura de 59 °C y pH de 8 con una relación E/S de 3,17. En estas condiciones se obtendrían un valor de IC50 para ABTS de 0,32 mg/ml de proteínas, de IC50 para DPPH de 10,52 mg/ml de proteínas y de 0,051 mM Trolox/mg de proteínas (Figura 4).

4. Conclusiones

El proceso de hidrólisis enzimática de pulmón bovino con papaína para la obtención de péptidos con poder antioxidante fue optimizado aplicando un diseño estadístico central compuesto. Los tres factores estudiados fueron la temperatura y el pH de reacción y la relación E/S. Se logró optimizar la capacidad antioxidante de los hidrolizados en el para tres técnicas: ABTS, DPPH y FRAP, alcanzando valores de 0,2707 IC50, 11.20 IC50 y 0,051 mM Trolox/mg, respectivamente, en el punto óptimo. Entonces, los valores de los factores para los cuales se obtuvo la máxima capacidad antioxidante fueron pH 8, relación ES 3,2 y temperatura 59°C.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor – Proyecto Específico 1130033 “Tecnologías de Preservación de Alimentos y de Aprovechamiento de Subproductos” INTA.

Referencias

- Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181-187. doi: 10.1007/s11746-998-0030-y
- Gutiérrez Púlido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2da. ed.). México: McGraw-Hill.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Rahman, U. u., Sahar, A., & Khan, M. A. (2014). Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. *Food Research International*, 65, Part C, 322-328. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.026>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Con formato: Fuente: 10 pto, Espa (alfab. internacional), No revisar la ortografía ni la gramática

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: 10 pto, Espa (alfab. internacional), No revisar la ortografía ni la gramática

Con formato: Fuente: 10 pto, Espa (Argentina), No revisar la ortografía ni la gramática

Con formato: Fuente: 10 pto, No revisar la ortografía ni la gramática